

Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuinon Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada Media Murashige-Skoog (MS) dengan Penambahan Ion Ca^{2+} dan Cu^{2+}

Callus growth and anthraquinones production of Indian mulberry (*Morinda citrifolia* L.) in Murashige-Skoog's medium (MS) supplemented with Ca^{2+} and Cu^{2+}

IKA ARININGSIH, SOLICHATUN*, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

* Korespondensi: olich@mipa.uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 17 Agustus 2002. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The objectives of the research were to study the effect of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions in Murashige-Skoog's medium on callus growth and anthraquinones production from *Morinda citrifolia* callus. The outline of the research was that the callus growth and secondary metabolite production from a plant's body could be triggered by the occurrence of elicitor that is added to the culture's medium, as biotic or abiotic elicitors. The addition of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions in the culture's medium as an abiotic elicitor would cause metal ion competition and interaction toward cells that are being cultured. Furthermore, it would influence ion transport from or to the cell cytoplasm. Finally, cytoplasm pH would be influenced so that both callus growth and secondary metabolite from the cultured cell will also be affected. This research used the in vitro callus culture method to obtain callus from explant (*Morinda citrifolia* leaf) and induced anthraquinone production. In vitro culture used in this research consisted of 3 stages. The first stage was the basal medium for sterilant objects. The second stage was the callus initiation medium to induce callus. The third stage was the treatment medium to induce anthraquinone production from callus. The research used factorial completely randomized design with 2 factors (Ca^{2+} ions: 0 mg l^{-1} , 440 mg l^{-1} , 880 mg l^{-1} and Cu^{2+} ions 0 mg l^{-1} , 2,5 mg l^{-1} , 5 mg l^{-1}), with 3 replicates. Data collected were qualitative data (explant sterilization and callus morphology) and quantitative data (callus growth rate, dry callus weight, and anthraquinone content). The data were analyzed using ANOVA, followed by DMRT with a 5% confidence level. The result of the research indicated that the treatment with the addition of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions on MS medium did not have any significant effect on callus growth and anthraquinone production.

Keywords: callus growth, anthraquinone, *Morinda citrifolia* L., Ca^{2+} , Cu^{2+} , callus culture

PENDAHULUAN

Industri obat-obatan tradisional berkembang pesat pada beberapa tahun terakhir ini, sejak konsep *back to nature* dalam dunia pengobatan dijadikan sebagai alternatif dengan memanfaatkan tanaman obat-obatan secara langsung. Penelitian terhadap tanaman obat-obatan tidak hanya pada aspek biologi dan kimiawinya saja, tetapi juga pada aspek farmakologis dan ilmu tanamannya sehingga komponen aktif dari tanaman obat tersebut dapat diketahui secara pasti (Subowo, 1996). Permasalahan umum yang muncul berkaitan dengan hal tersebut menurut Sumaryono (1996) adalah tentang bahan baku tanamannya baik dalam hal pembudidayaan maupun dari sudut pandang biosintesis metabolit sekunder dalam tanaman sebagai konstituen aktif yang berkhasiat obat secara kualitas maupun kuantitas.

Morinda citrifolia L. (mengkudu) dari familia Rubiaceae merupakan salah satu spesies tanaman obat yang telah digunakan untuk menyembuhkan beberapa macam penyakit, seperti antibakteri, analgesik, anti-kongestif, sedatif, dan aktivitas

insektisida serta dapat membantu menyembuhkan peradangan amandel, meningkatkan daya tahan tubuh, menormalkan tekanan darah, dan mengatasi siklus energi tubuh (Abdullah *et al.*, 1998; Paimin, 2001). Aspek penting tanaman mengkudu yang digunakan dalam pengobatan adalah kandungan metabolit sekundernya yang berupa glikosida antrakuinon dalam bentuk "morindon" sebagai obat pencahar (Thomas, 1989; Robinson, 1991; Harborne, 1996).

Produksi metabolit sekunder melalui kultur in vitro merupakan pilihan yang mempunyai harapan dibandingkan dengan produksi tanaman utuh (Kurz dan Constabel, 1991). Hal ini disebabkan teknik kultur jaringan memiliki banyak keuntungan antara lain tidak tergantung pada faktor lingkungan, sistem produksinya dapat diatur sehingga kualitas dan produksinya lebih konsisten untuk memenuhi kebutuhan pasar serta dapat mengurangi penggunaan lahan (Wiendi dkk. dalam Sitinjak, 2000). Meskipun teknik kultur jaringan mempunyai keuntungan yang besar, namun masih mempunyai kekurangan yaitu produksi metabolit sekunder yang masih rendah pada beberapa kultur tumbuhan.

Untuk mengatasinya perlu dilakukan teknik elisitasi (Buitalaar dan Tramper dalam Sitinjak, 2000).

Elisitasi menurut Barz *et al.* dalam Sitinjak (2000) merupakan teknik untuk merangsang pembentukan fitoaleksin dan meningkatkan produksi metabolit sekunder yang terakumulasi akibat cekaman. Substansi yang dapat dijadikan sebagai elisitor dapat berupa zat pengatur tumbuh (ZPT) dan komponen abiotik seperti cahaya, temperatur, prekursor, dan kondisi nutrisi pada medium.

Dalam penelitian ini, digunakan tanaman *M. citrifolia* untuk produksi antrakuinon melalui kultur kalus dengan menggunakan elisitor abiotik, yaitu penambahan ion Ca^{2+} yang dikombinasikan dengan Cu^{2+} pada konsentrasi tertentu di media kultur. Media yang digunakan adalah media Murashige-Skoog (MS), dengan ZPT berupa 0,5 mg/l NAA dan 0,5 mg/l kinetin pada temperatur $27 \pm 3^\circ\text{C}$, hal ini mengacu pada hasil penelitian sebelumnya pada *Morinda elliptica* oleh Abdullah *et al.* (1998) yang telah terbukti meningkatkan produksi antrakuinon.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan selama 8 bulan, yaitu mulai dari bulan September 2001 sampai bulan April

Tabel 1. Uji sterilan pada eksplan daun *M. citrifolia*.

No	Sterilan	Tingkat Kontaminasi	Kesegaran Jaringan	Jenis Kontaminan	
				Jamur	Bakteri
1	Alkohol 70%-10 menit Clorox 70%-05 menit	75%	+/-	++	++
2	Alkohol 70%-10 menit Clorox 50%-05 menit	75%	+	+	++
3	Alkohol 50%-05 menit Clorox 45%-05 menit	50%	++	+	++
4	Alkohol 45%-05 menit Clorox 45%-03 menit	50%	+++	+	+

Keterangan: Kesegaran Jaringan : (-) Tidak Segar, (+) Kurang Segar, (++) Cukup Segar, (++++) Segar; Banyaknya Kontaminan : (+) Sedikit, (++) Sedang

Tabel 2. Warna dan tekstur kalus *M. citrifolia* pada media perlakuan.

No	Perlakuan	Warna		Tekstur	
		Awal	Akhir	Awal	Akhir
1	C ₀ E ₀	1++	1+++ , 2, 4	Kompak berair	Kompak berair
2	C ₀ E ₁	1++ , 1+	1++++ , 1++++ , 2	Kompak berair	Kompak berair
3	C ₀ E ₂	1++ , 1+	1++++ , 1++++ , 2, 3, 4	Kompak berair	Kompak berair
4	C ₁ E ₀	1++ , 1+	1++++ , 1++++ , 2, 4	Kompak berair	Kompak berair
5	C ₁ E ₁	1++ , 1+	1++++ , 1++++ , 2, 3, 4	Kompak berair	Kompak berair
6	C ₁ E ₂	1++	1++++ , 1++++ , 2	Kompak berair	Kompak berair
7	C ₂ E ₀	1+ , 1++	1++++ , 1++++	Kompak berair	Kompak berair
8	C ₂ E ₁	1++ , 1+	1++++ , 1++++ , 2, 3, 4	Kompak berair	Kompak berair
9	C ₂ E ₂	1++	1++++ , 1++++ , 2	Kompak berair	Kompak berair

Keterangan:

Perlakuan: C₀E₀: Ca^{2+} 0 mg/l dan Cu^{2+} 0 mg/l, C₀E₁: Ca^{2+} 0 mg/l dan Cu^{2+} 2,5 mg/l, C₀E₂: Ca^{2+} 0 mg/l dan Cu^{2+} 5 mg/l, C₁E₀: Ca^{2+} 440 mg/l dan Cu^{2+} 0 mg/l, C₁E₁: Ca^{2+} 440 mg/l dan Cu^{2+} 2,5 mg/l, C₁E₂: Ca^{2+} 440 mg/l dan Cu^{2+} 2,5 mg/l, C₂E₀: Ca^{2+} 880 mg/l dan Cu^{2+} 0 mg/l, C₂E₁: Ca^{2+} 880 mg/l dan Cu^{2+} 5 mg/l, C₂E₂: Ca^{2+} 880 mg/l dan Cu^{2+} 5 mg/l. Intensitas warna: 1+: coklat muda, 1++: coklat sedang, 1+++ : coklat tua, 1++++: coklat sangat tua, 2: coklat kehitaman, 3: hijau kekuningan, 4: kuning bening.

2002, bertempat di Sub-Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Bahan-bahan yang digunakan meliputi bahan tanaman yang berupa daun *M. citrifolia* muda dan bahan kimia yang meliputi akuades, detergen cair, alkohol absolut, desinfektan (mengandung natrium hipoklorit 5,25%), komposisi media dasar Murashige-Skoog (MS), sukrosa, ZPT (NAA dan kinetin), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Agar, HCl 1 N, NaOH 1 N, dan diklorometan. Adapun alat-alat yang digunakan meliputi botol kultur, laminar air flow, cawan petri, hot plate, gelas ukur, magnetik stirer, vortex, erlenmeyer, keranjang autoklaf, oven, skalpel, gelas beker, pinset, bunsen burner, gunting, neraca analitik, aluminium foil, pH meter, tissue gulung, kertas label, pipet volumetrik, pipet tetes, autoklaf, mortal, corong kaca, gelas piala, tabung reaksi, rak tabung reaksi, rak media, kuvet, dan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu.

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial yang terdiri atas dua faktor. Faktor pertama yaitu penambahan Ca^{2+} dengan tiga taraf yang meliputi C₀ (konsentrasi 0 mg/l), C₁ (konsentrasi 440 mg/l), dan C₂ (konsentrasi 880 mg/l). Sedangkan faktor kedua yaitu penambahan Cu^{2+} dengan tiga taraf yang meliputi E₀ (konsentrasi 0 mg/l), E₁ (konsentrasi 2,5 mg/l), dan E₂ (konsentrasi 5 mg/l). Sehingga menghasilkan 9 kombinasi perlakuan, masing-masing dengan tiga ulangan.

Pelaksanaan penelitian diawali oleh sterilisasi peralatan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 1 jam. Media dasar menggunakan media Murashige-Skoog (MS). Untuk media inisiasi kalus, media dengan komposisi seperti pada media dasar ditambah NAA 0,5 mg/l, kinetin 0,5 mg/l, dan sukrosa 2,1 g, sedangkan untuk media perlakuan, seperti pada media inisiasi kalus ditambah dengan Ca^{2+} 0 mg/l, 440 mg/l, 880 mg/l, dan Cu^{2+} 0 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l.

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan membersihkan daun *M. citrifolia* dengan detergen, lalu membilasnya dibawah air mengalir, memotongnya dengan ukuran 3X3 cm, dan merendamnya dalam larutan steril alkohol 45% selama 5 menit, akuades steril selama 5 menit, clorox (mengandung NaClO 5,25%) 45% selama 3 menit, akuades steril selama 5 menit serta dibilas dalam akuades steril 3 kali.

Eksplan steril kemudian di subkultur pada media inisiasi kalus dan setelah kalus terbentuk dan berusia 4 bulan, kalus di subkultur pada media perlakuan dengan ukuran 1X2 cm². Pemeliharaan dilakukan dengan menyemprot botol-botol kultur dengan alkohol 70% satu kali sehari, diberi penerangan lampu neon 20 watt, dan suhu ruang dijaga \pm 25°C. Kalus diamati pertumbuhannya setiap hari dan pada hari terakhir sebelum pemanenan diamati warna kalus, tekstur kalus, dan berat basah kalus awal. Pemanenan dilakukan pada umur kalus 54 hari kalus pada media perlakuan dan dilakukan pengukuran berat basah kalus akhir, berat kering kalus, dan analisis kandungan antrakuinon.

Parameter yang diamati meliputi berat basah kalus awal dan berat basah kalus akhir untuk pengukuran laju pertumbuhan kalus, berat kering kalus dan analisis antrakuinon secara spektrofotometer dengan cara mengekstrak 0,020 \pm 0,001 g serbuk sel-sel kalus kering dalam tabung reaksi dengan menambahkan 2 ml diklorometan beberapa kali kemudian ekstrak diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm dengan menggunakan alizarin sebagai larutan perbandingan (Zenk *et al.* dalam Abdullah *et al.*, 1998). Kontaminasi pada uji sterilitas dilakukan secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikro-organismenya (jamur dan bakteri) (Kyte dan Kleyn, 1996; Tim mikrobiologi, 1999).

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) taraf 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi eksplan

Dari berbagai metode sterilisasi eksplan yang dilakukan (lihat Tabel 1), diperoleh sterilisasi eksplan terbaik dengan menggunakan alkohol 45% selama 5 menit dan clorox (mengandung 5,25% NaClO) 45% selama 3 menit. Metode sterilisasi terbaik ditandai dengan rendahnya persentase kontaminasi dan tingginya tingkat kesegaran jaringan. Metode ini kemudian digunakan pada perlakuan selanjutnya.

Morfologi kalus

Morfologi kalus pada media inisiasi kalus

Eksplan yang tidak terkontaminasi dan segar ditanam pada media inisiasi kalus yang mengandung auksin (NAA 0,5 mg/l) dan sitokinin (kinetin 0,5 mg/l) dalam konsentrasi seimbang. Kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang demikian ini dimaksudkan untuk merangsang pembesaran, proliferasi sel, dan pertumbuhan kalus dari eksplan yang ditanam. Kalus merupakan kumpulan sel-sel amorf yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah secara terus-menerus (Sudarto, 1988). Kalus ini akan terbentuk pada media yang mengandung konsentrasi auksin dan sitokinin dalam kondisi seimbang (Abidin, 1994).

Eksplan pada media inisiasi kalus mengalami penambahan volume karena terjadinya pembesaran ukuran sel-selnya. Akibatnya, ukuran eksplan menjadi dua kali ukuran semula. Setelah eksplan berusia dua minggu dari saat tanam, muncul kalus dari daerah-daerah luka terutama pada tepi potongan eksplan. Hal ini ditandai dengan munculnya bercak-bercak berwarna keputih-putihan yang semakin lama berubah warna menjadi kuning kecoklatan.

Morfologi kalus pada media perlakuan

Kondisi kalus yang disubkultur pada media perlakuan mempunyai tekstur yang kompak berair dengan warna kecoklatan. Semakin lama kalus ditanam pada media perlakuan, warnanya semakin coklat tua bahkan cenderung coklat kehitaman dan muncul kalus muda yang berwarna kuning bening (*yellowish*) dengan tekstur kompak.

Tekstur dan warna kalus *M. citrifolia* pada media perlakuan di akhir pengamatan (hari ke 54) dapat dilihat pada tabel 2. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa tekstur kalus yang diperoleh adalah kompak dengan permukaan bawah berair. Susunan tekstur kalus ini menurut Street (1972) merupakan susunan sel-sel kalus yang rapat, padat, sulit dipisahkan, mempunyai proporsi vakuola yang lebih besar, dan mempunyai dinding sel polisakarida yang besar. Pada permukaan bawah eksplan terlihat kondisi jaringan yang berair. Kondisi ini disebabkan adanya bagian yang langsung bersentuhan dengan media dan berperan sebagai area penyerapan nutrisi bagi eksplan.

Perubahan warna kalus secara jelas dapat dilihat setelah eksplan berusia 54 hari di media perlakuan (Tabel 2). Perubahan warna yang terjadi pada kalus dari coklat muda menjadi coklat tua dan coklat kehitaman disebabkan oleh usia kalus yang dikulturkan semakin tua. Abdullah *et al.* (1998) menyatakan bahwa sel-sel muda yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Kondisi warna kalus yang bervariasi menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) bisa disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan mungkin disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi sehingga oleh pengaruh cahaya akan menyebabkan teroksidasinya fenol menjadi kuinon fenolik (Hendaryono, 2000).

Antrakuinon merupakan salah satu produk metabolisme sekunder yang dihasilkan oleh eksplan dan termasuk golongan kuinon fenolik yang dalam biosintesisnya berasal dari turunan fenol. Oleh sebab itu, maka dalam proses seleksi eksplan yang akan dikulturkan pada media perlakuan biasanya didasarkan pada warna dari eksplan yang akan dikulturkan. Menurut Indrayanto (1987) terdapat korelasi antara warna kultur dengan kandungan metabolit sekunder seperti antosianin dan antrakuinon.

Pada perlakuan dengan penambahan ion Cu^{2+} dalam media terlihat bahwa semakin banyak ion Cu^{2+} yang ditambahkan, maka warna kalus menjadi lebih tua. Kondisi ini disebabkan oleh akumulasi fenol yang cukup besar pada kalus sebagai akibat dari absorpsi ion Cu^{2+} yang lebih dari cukup. Hal ini berkaitan dengan peran Cu^{2+} sebagai kofaktor untuk enzim polifenol oksidase yang akan memicu perubahan fenol menjadi kuinon (Prawirana et al., 1995). Dengan demikian, warna yang lebih tua pada kalus menunjukkan adanya aktivitas biosintesis metabolit sekunder yang lebih besar.

Laju pertumbuhan kalus

Dari hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa semua faktor utama baik penambahan ion Ca^{2+} maupun Cu^{2+} dalam berbagai konsentrasi dan interaksi perlakuan antara kedua ion tersebut dalam berbagai konsentrasi tidak berpengaruh nyata terhadap laju pertumbuhan kalus. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya substitusi dalam absorpsi ion-ion yang mempunyai fungsi sama, sehingga laju pertumbuhan kalus tetap terjaga kestabilannya. Selain itu juga karena lamanya waktu di media perlakuan yang pendek menyebabkan stres ion metal kurang berpengaruh terhadap sel-sel kalus yang dikulturkan. Laju pertumbuhan kalus *M. citrifolia* pada media perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Laju pertumbuhan kalus *M. citrifolia* pada media perlakuan (mg hr^{-1}).

Penambahan Ca^{2+}	Penambahan Cu^{2+}			Rerata C
	E_0	E_1	E_2	
C_0	4,470 ^a	0,923 ^a	1,873 ^a	2,422 ^a
C_1	2,327 ^a	0,630 ^a	2,670 ^a	1,876 ^a
C_2	1,857 ^a	2,073 ^a	1,813 ^a	1,914 ^a
Rerata E	2,884 ^a	1,209 ^a	2,119 ^a	

Laju pertumbuhan kalus, baik pada media inisiasi maupun pada media perlakuan, sangat lambat. Lambatnya pertumbuhan kalus pada media inisiasi kalus diduga disebabkan oleh kondisi internal dari eksplan itu sendiri baik secara morfologi maupun anatomi. Hal ini dapat dilihat dari kondisi permukaan helaian daun yang dijadikan sebagai sumber eksplan yang terlindungi oleh lapisan kutikula yang cukup tebal (khususnya pada permukaan atas) sehingga menghambat absorpsi zat hara dari media. Adapun secara anatomis dapat diketahui dari struktur anatomi dari daun familia Rubiaceae yang mempunyai saluran pembuluh kecil hingga sedang dan mempunyai parenkim dengan serat-serat bersekat (Bhattacharya dan Johri, 1998). Kondisi demikian dapat menghambat aliran ion antar sel-selnya.

Lambatnya laju pertumbuhan kalus pada media perlakuan diduga disebabkan oleh adanya hambatan pertumbuhan pada tahapan-tahapan siklus sel untuk membelah dan memperbanyak diri. Salah satunya dapat dilihat pada tahap interfase yang kemungkinan berlangsung lama pada G_1 (tahap sel anakan yang terbentuk mulai tumbuh

menjadi sel dewasa untuk tahap persiapan berikutnya) (Rekso-atmodjo, 1993). Selain itu juga dapat dilihat pada anafase yang menurut Reksoatmodjo (1993) berkaitan dengan keberadaan ion Ca^{2+} yang berperan sebagai pemrakarsa pada proses anafase. Namun demikian, adanya kompetisi yang mungkin terjadi dalam penyerapan nutrisi oleh sel-sel kalus menyebabkan kadar ion Ca^{2+} yang terkandung dalam sitosol cenderung seimbang dalam tiap perlakuan sehingga pembelahan sel-sel kalus memiliki laju yang sama.

Berat kering kalus

Berat kering kalus umur 54 hari pada media perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Berat kering kalus *M. citrifolia* (mg).

Penambahan Ca^{2+}	Penambahan Cu^{2+}			Rerata C
	E_0	E_1	E_2	
C_0	54,8 ^a	66,7 ^a	63,5 ^a	62,3 ^a
C_1	56,9 ^a	67,2 ^a	52,0 ^a	58,7 ^a
C_2	51,6 ^a	52,6 ^a	50,3 ^a	51,5 ^a
Rerata E	54,4 ^a	62,2 ^a	55,9 ^a	

Dari hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa semua faktor utama baik penambahan ion Ca^{2+} maupun Cu^{2+} dalam berbagai konsentrasi dan interaksi perlakuan antara kedua ion tersebut dalam berbagai konsentrasi tidak berpengaruh nyata terhadap berat kering kalus. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya kombinasi konsentrasi penambahan ion Ca^{2+} dan Cu^{2+} pada media akan menyebabkan terjadinya interaksi antara kedua ion tersebut maupun dengan ion-ion lainnya yang terdapat dalam media dalam hal absorpsi komponen zat hara oleh sel-sel kalus. Akibatnya, kompetisi antar ion-ionpun terjadi dan kon dis ini akan memicu sel-sel kalus untuk mengabsorpsi ion-ion lain secara berlebih guna mensubstitusi kekurangan akan salah satu ion yang dibutuhkan. Sebagai contoh, kekurangan ion Ca^{2+} dapat digantikan dengan mengabsorpsi ion N yang lebih banyak dan kekurangan ion Cu^{2+} dapat digantikan dengan mengabsorpsi ion Zn yang lebih banyak. Hal ini disebabkan oleh adanya sifat antagonisme dari kedua ion tersebut, yaitu adanya penghambatan penyerapan salah satu ion apabila ion satunya dalam kondisi berlebih maupun sebaliknya (Srivastava dan Gupta, 1996).

Kandungan antrakuinon kultur kalus *M. citrifolia*

Antrakuinon merupakan salah satu produk metabolisme sekunder yang dihasilkan oleh spesies *M. citrifolia* di alam. Metabolit ini tidak hanya terakumulasi pada buah saja, tetapi juga pada daun (Abdullah et al., 1998; Mursito, 2000). Hasil penelitian menunjukkan adanya senyawa antrakuinon dari ekstrak sel-sel kalus *M. citrifolia*, yaitu dengan munculnya warna kuning bening yang semakin tua pada konsentrasi antrakuinon yang lebih tinggi. Kadar antrakuinon yang diperoleh untuk tiap-tiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Kadar antrakuinon kalus *M. citrifolia* umur 54 hari pada media perlakuan (mmol⁻¹).

Penambahan Ca ²⁺	Penambahan Cu ²⁺			Rerata C
	E ₀	E ₁	E ₂	
C ₀	68 ^a	60 ^a	46 ^a	58 ^a
C ₁	66 ^a	65 ^a	40 ^a	57 ^a
C ₂	33 ^a	47 ^a	54 ^a	45 ^a
Rerata E	56 ^a	58 ^a	47 ^a	

Keterangan Tabel 3-5: Penambahan Ca²⁺: C₀: 0 mg/l, C₁: 440 mg/l, C₂: 880 mg/l. Penambahan Cu²⁺: E₀: 0 mg/l, E₁: 2,5 mg/l, E₂: 5 mg/l. Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

Dari hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa semua faktor utama baik penambahan ion Ca²⁺ maupun Cu²⁺ dalam berbagai konsentrasi dan interaksi perlakuan antara kedua ion tersebut dalam berbagai konsentrasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar antrakuinon yang dihasilkan. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya elisitor abiotik khususnya pemberian ion-ion metal (Ca²⁺ pada konsentrasi 0 mg/l, 440 mg/l, 880 mg/l dan Cu²⁺ pada konsentrasi 0 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l) kurang berpengaruh terhadap proses pengasaman media dan aktivitas enzim yang terlibat dalam sintesis antrakuinon, sehingga dari semua perlakuan yang diberikan menunjukkan hasil perolehan kadar yang hampir sama.

Tingkat keasaman media berpengaruh terhadap proses metabolisme sekunder dari tanaman. Pengasaman media dapat dilakukan dengan berbagai cara, seperti alkalisasi eksternal, penambahan yeast, pemberian asam lemah, maupun pemberian ion Ca²⁺ dalam media (Roos et al., 1998; Johannes et al., 1998). Diperolehnya kadar antrakuinon yang tidak berbeda nyata pada uji statistik diduga disebabkan oleh pH media dari semua perlakuan masih sama seperti kondisi pH semula. Oleh karena itu, sintesis antrakuinon dari sel-sel kalus yang diinduksikan berlangsung dengan laju sintesis yang tetap seperti semula. Hal ini berarti bahwa stres ion metal (Ca²⁺ pada konsentrasi 0 mg/l, 440 mg/l, 880 mg/l dan Cu²⁺ pada konsentrasi 0 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l) kurang efektif untuk produksi antrakuinon dari kultur kalus *M. citrifolia*.

KESIMPULAN

Penambahan ion Ca²⁺ (0 mg/l, 440 mg/l, 880 mg/l), ion Cu²⁺ (0 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l), maupun kombinasi antara ion Ca²⁺ dan Cu²⁺ tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus (laju pertumbuhan kalus, berat kering kalus), dan kadar antrakuinon dari kalus *M. citrifolia* yang dikulturkan. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menurunkan konsentrasi penambahan ion Cu²⁺ dibawah 2,5 mg l⁻¹ pada media dasar Murashige-Skoog (MS) dan penambahan ion Ca²⁺ dibawah 440 mg/l serta masa tanam kalus dalam media perlakuan yang diperpanjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A., A.M. Ali, M. Marziah, N.H. Lajis and A.B. Ariff. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 173-182.
- Abidin, Z. 1994. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Bhattacharyya, B. and B.M. Johri. 1998. *Flowering Plants Taxonomy and Phylogeny*. New Delhi: Narosa Publishing House.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia* (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro). Bandung: Penerbit ITB.
- Hendaryono, D.P.S. dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan, Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Hendaryono, D. P. S. 2000. *Pembibitan Anggrek dalam Botol*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Indrayanto, G. 1987. Produksi metabolit sekunder dengan teknik kultur jaringan tanaman. *Buku Risalah Seminar Nasional Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Johannes, E., A. Crafts, and D. Sanders. 1998. Control of Cl⁻ efflux in *Chara corallina* by cytosolic pH, free Ca²⁺, and phosphorylation indicates a role of plasma membrane anion channels in cytosolic pH regulation. *Plant Physiology* 118: 173-181.
- Kurz, W. G. W. dan F. Constabel. 1991. Produksi dan isolasi metabolit sekunder. Dalam L. R. Wetter dan F. Constabel. *Metode Kultur Jaringan Tanaman* (diterjemahkan oleh Mathilda B. Widiyanto). Bandung: Penerbit ITB.
- Kyte, L. and J. Kleyn. 1996. *Plants Form Test Tubes, An Introduction to Micropopagation*. Portland: Timber Press.
- Mursito, B. 2000. *Tampil Percaya Diri dengan Ramuan Tradisional*. Jakarta: P. T. Penebar Swadaya.
- Paimin, F. R. 2001. Tanaman obat di sekitar kita. *Trubus* 32 (379): 49
- Prawiranata, W., S. Harran dan P. Tjondronegoro. 1995. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan Jilid 1*. Bogor: Departemen Botani FMIPA IPB.
- Reksoatmodjo, I. 1993. *Biologi Sel*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata). Bandung: Penerbit ITB.
- Ross, W., S. Evers, M. Hieke, M. Tschöpe and B. Schuman. 1998. Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiology* 118: 349-364.
- Sitnajak, R. R. 2000. Pengaruh pemberian ekstrak *Saccharomyces cereviceae* Hansen terhadap kandungan gossipol pada kultur kalus *Gossypium hirtusum* L. *Berita Biologi* 5 (2): 131-132
- Srivastava, P. C. and U. C. Gupta. 1996. *Trace Element in Crop Production*. New York: Science Publishers, Inc.
- Street, H.E. (ed.). 1972. Plant tissue and cell culture. *Botanical Monographs*. II: 258-260.
- Subowo. 1996. Efek imunodulator dari tumbuhan obat. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 3 (1): -
- Sudarto, K. 1988. Usaha menumbuhkan kalus dalam kultur jaringan *Allium sativum* Linn. *Buku Risalah Temu Ilmiah*. Yogyakarta: UGM Press. pp: 48-52.
- Sumaryono, W. 1996. Teknologi pembuatan sediaan fitofarmaka skala industri. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 3 (1): -
- Thomas, A. N. S. 1989. *Tanaman Obat Tradisional 1*. Jakarta: Penerbit Kanisius.